

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-171681

(P2023-171681A)

(43)公開日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 8/9789(2017.01)

A 6 1 K 8/9789

A 6 1 Q 17/00 (2006.01)

A 6 1 Q 17/00

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全18頁)

(21)出願番号 特願2023-178167(P2023-178167)  
 (22)出願日 令和5年10月16日(2023.10.16)  
 (62)分割の表示 特願2020-546724(P2020-546724)  
 )の分割  
 原出願日 令和1年7月11日(2019.7.11)  
 (31)優先権主張番号 特願2018-172325(P2018-172325)  
 (32)優先日 平成30年9月14日(2018.9.14)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)

(71)出願人 000003160  
 東洋紡株式会社  
 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号  
 (72)発明者 菅原 知宏  
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋  
 紡株式会社内

(54)【発明の名称】 抗酸化剤

(57)【要約】

【課題】生体内において抗酸化関連酵素またはレドックス関連因子の発現を促進することにより、安全かつ効率的に生体の酸化ストレスを減少させ、健康を維持し、また酸化ストレスに起因する様々な疾患及び症状を防ぐための抗酸化剤を提供する。

【解決手段】ネムノキ抽出物を含有する、特に、酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現亢進作用を有する抗酸化剤。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ネムノキ樹皮から水により抽出する工程を含む、抗酸化剤として使用（ヒトに対する治療行為を除く）するためのネムノキ樹皮抽出物の製造方法。

## 【請求項 2】

抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現を亢進せしめることにより抗酸化剤として使用（ヒトに対する治療行為を除く）する、請求項 1 に記載のネムノキ樹皮抽出物の製造方法。

## 【請求項 3】

抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子が、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、ペルオキシレドキシシン（PRX）、チオレドキシシン（TXN）、チオレドキシシンレダクターゼ（TRD）、グルタチオンレダクターゼ（GRD）およびグルタレドキシシン（GXN）からなる群より選択される少なくともいずれか 1 種以上である、請求項 2 に記載のネムノキ樹皮抽出物の製造方法。 10

## 【請求項 4】

ネムノキ樹皮抽出物が細胞内活性酸素低減作用を有する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のネムノキ樹皮抽出物の製造方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のネムノキ樹皮抽出物を配合されてなる、皮膚外用剤としての使用方法（ヒトに対する治療行為を除く）。 20

## 【請求項 6】

ネムノキ樹皮抽出物を 0.00001 ~ 5.0 重量%濃度で含有する、請求項 5 に記載の皮膚外用剤としての使用方法（ヒトに対する治療行為を除く）。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ネムノキ抽出物を有効成分とする抗酸化剤に関する。特に、細胞に作用することにより、細胞に有する抗酸化能を向上させる上で有用な抗酸化剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、特に生体成分を酸化させる要因として、様々な活性酸素種が注目されており、その生体への悪影響が問題となっている。活性酸素種は定常状態の酸素分子に比べて化学反応性が高まった酸素分子とその関連分子種を指し、生体内のエネルギー代謝過程で生じる。活性酸素種は、ラジカル種としてスーパーオキシド（ $\cdot O_2^-$ ）、ヒドロキシラジカル（ $\cdot OH$ ）、ヒドロペルオキシラジカル（ $HO_2\cdot$ ）、一酸化窒素（NO）、非ラジカル種として過酸化水素（ $H_2O_2$ ）、一重項酸素（ $^1O_2$ ）、ペルオキシニトライト（ $ONOO^-$ ）、脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）等が挙げられる。これらの活性酸素種は、生体内のシグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとなり、細胞増殖・分化の制御やマクロファージ等における殺菌作用等の生命活動に欠かせない分子種である。一方、過剰の活性酸素種は細胞・組織に障害を与え、有害であると考えられている。 30

## 【0003】

これらの過剰な活性酸素種による酸化ストレスに対して、生体は酸化ストレスを防御する抗酸化機構として、活性酸素種産生抑制機構を備えている。活性酸素種産生抑制機構では、主としてカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）グルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）等の抗酸化関連酵素から構成され、酵素反応により活性酸素種を抑制する。活性酸素種はスーパーオキシドから過酸化水素、ヒドロキシラジカルと移行変わるが、その過程でSODはスーパーオキシドの消去、カタラーゼは過酸化水素の消去を行う。また、GPX、グルタチオンレダクターゼ（GRD）、チオレドキシシンレダクターゼ（TRD）、ペルオキシレドキシシン（PRX）は、グルタチオン（GSH）やチオレドキシシン（TXN）の酸化・還元状態を制御することで、過酸化水素やヒドロキシラジカル 40

を消去する。これらの抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子である協奏して働くことで、細胞内の活性酸素種量は適切な水準で保たれている。

【0004】

このように、生体内の活性酸素種による細胞傷害を抑制するため、上述の抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子の発現量を増大させることが有効であると考えられる。これら抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子は、紫外線照射ストレスによって亢進されることが知られているが、生体に安全かつ有効に作用し、抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子の発現を促進する成分が期待されている。

【0005】

このような成分として、例えば茶葉の植物に広く分布するフラボノール類に属するケンフェロール及びクエルセチンが、生体内におけるグルタチオン系及びチオレドキシンの発現及び活性を亢進することが報告されている（特許文献1）。

10

【0006】

生体内の抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子に対して、安全かつ有効に作用する成分を探索することは、より安全性でより有効性の高い成分を市場に提供するという観点のみならず、製剤の多様化、処方配合上の選択肢の拡大、異なる成分を組み合わせることによる相乗効果といった観点からも重要であり、抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子に対して作用する新規成分の開発が求められていることは言うまでもない。

【0007】

一方、ネムノキは、日本国内では東北地方以南の山地の林縁、原野等の日当たりのよい湿地に自生するマメ科の落葉高木で、海外においては中国、東南アジア等にも等にも分布し、栽培される。花期の頃に樹皮を採取し、水洗いしてから天日乾燥して適当な長さに刻んだものを合歓皮と称し、民間では関節炎、腰痛、利尿、浮腫、強壯を期待して服用され、外用として腫物、打撲傷、関節痛に煎じ液で患部を冷湿布したり、あるいは浴湯料として使用されてきた。樹皮にはトリテルペン系サポニン（多数のジュリプロシド類）、フラボノイド（ゲラルドン、イソオカニン、ルテオリン等）やタンニン等を含むことが知られている。（非特許文献1）

20

【0008】

ネムノキによる生体への影響として、ネムノキ属植物由来成分を有効成分とした活性酸素消去作用およびアルドースリダクターゼ阻害作用が報告されているが、本効果は活性酸素消去作用に着目しており、つまりその作用はスカベンジャー効果に留まることから、生体の抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子を刺激して活性酸素消去を達成する類のものではない（特許文献2）。また、ネムノキ樹皮抽出物のメラニン産生抑制作用、皮膚用コラーゲン産生促進作用が報告されているが、抗酸化関連因子への言及はない（特許文献3）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特許第5833438号公報

40

【特許文献2】特開2000-128798号公報

【特許文献3】特許第5253862号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】和漢薬No.759（2016年8月）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、上記の背景を鑑み、生体内において抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の発現を促進することにより、安全かつ効率的に生体の酸化ストレスを減少さ

50

せ、健康を維持し、また酸化ストレスに起因する様々な疾患及び症状を防ぐことを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究の結果、ネムノキ抽出物が抗酸化作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。ネムノキ抽出物について、生体内における抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の中でも、SOD、TXN、PRX、TRD、GRD、グルタレドキシシン(GXN)の遺伝子発現を亢進することを見出した。生体内における抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の発現を促進するための有効成分として、本発明の抗酸化剤を用いることで、適用される生体にストレスを与ることなく、生体内の過剰な活性酸素種を消去し、生体内の多種多様な酸化ストレスを軽減することが可能となる。

10

【0013】

即ち、本発明の概要は以下の通りである。

項1.

ネムノキ抽出物を含有する抗酸化剤。

項2.

ネムノキ抽出物がネムノキ属植物の植物体からの水抽出物である項1に記載の抗酸化剤。

項3.

ネムノキ抽出物が、抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現亢進作用を有する項1または2に記載の抗酸化剤。

20

項4.

抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子が、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、ペルオキシレドキシシン(PRX)、チオレドキシシンレダクターゼ(TRD)、グルタチオンレダクターゼ(GRD)およびグルタレドキシシン(GXN)からなる群より選択される少なくともいずれか1種以上である、項1から3のいずれかに記載の抗酸化剤。

項5.

ネムノキ抽出物が、細胞内活性酸素低減作用を有することを特徴とする項1から4のいずれかに記載の抗酸化剤。

30

項6.

項1～5のいずれかに記載の抗酸化剤を配合されてなる皮膚外用剤。

項7.

ネムノキ抽出物が0.00001～5.0重量%濃度で含有する項6に記載の皮膚外用剤。

【発明の効果】

【0014】

本発明の抗酸化剤を使用することにより、生体内の抗酸化能を向上させることが期待でき、抗酸化能を向上させる効果を目的とした皮膚外用剤を提供することもできる。

【図面の簡単な説明】

40

【0015】

【図1】実施例1において、ヒト正常新生児表皮角化細胞における標的遺伝子(SOD)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図2】実施例1において、ヒト正常新生児表皮角化細胞における標的遺伝子(TXN)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図3】実施例1において、ヒト正常新生児表皮角化細胞における標的遺伝子(GXN)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図4】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(SOD)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図5】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(TXN)に

50

対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図6】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(G X N)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図7】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(P R X)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図8】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(T R D)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図9】実施例2において、ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子(G R D)に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【図10】実施例3において、ヒト正常新生児線維芽細胞における活性酸素低減作用の評価を行った結果を示す図である。 10

【図11】実施例4において、生体から採取した細胞における抗酸化関連遺伝子に対する発現亢進作用の評価を行った結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明において用いるネムノキ抽出物の抽出法の具体的な例を以下に示す。抽出物における植物体の部位は主に樹皮を用いるが、樹皮に特定せず植物体全体を用いることもできる。また、以下に記載された例に限定されないことは言うまでもない。

【0017】

本発明において、ネムノキ抽出物とは、ネムノキ属植物の植物体そのものの他、その裁断物、乾燥粉末、およびその抽出物を指す。そして、この「抽出物」は、抽出溶媒を含んだ状態および抽出溶媒を除去した状態のいずれをも包含するものであり、また、抽出溶媒除去後にさらに精製処理に供したものも包含する。 20

【0018】

ネムノキ抽出物とは、ネムノキ属植物の植物体、典型的にはその枝葉部から抽出され、生のままあるいは乾燥して粉碎し、その後、抽出溶媒として、水、好ましくは70~100の熱水、または有機溶媒を用いて抽出を行うことにより得られる。抽出は必要に応じて、水抽出と有機溶媒抽出を組み合わせを行うこともできるが、生体へ適用した場合の影響を考慮すると、水抽出のみで行うことが好ましい。例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類；プロピレングリコール、ブチレングリコール等の多価アルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテル等の炭化水素類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；ピリジン類；油脂、ワックス、その他オイル類が挙げられ、このうち、水、アルコール類、水-アルコール混液が好ましく、特に好ましくは熱水を抽出溶媒として用いるのが好ましい。 30

【0019】

熱水抽出する場合は、典型的には、ネムノキ属植物の植物体粉碎物を加熱還流下で抽出が行われる。抽出条件は、使用する溶媒によっても異なるが、例えば水により抽出する場合、ネムノキ1重量部に対して1~100重量部の水を用い、4~100の温度で、10分~7日間かけて抽出することが好ましく、ネムノキの樹皮1重量部に対して5~20重量部の水を用い、70~100の温度で、30分~2時間かけて抽出することがより好ましい。また、抽出効率をより高めるという観点から、加圧、攪拌、超音波処理等を、抽出処理の際に併せて行ってもよい。さらに、かかる抽出処理後に、濾過や遠心分離によって残渣と分離してもよい。 40

【0020】

ネムノキ抽出物は、抽出溶媒を減圧により留去すれば、タール状で黒茶色の抽出物を与えることが普通であり、必要に応じて賦形剤を添加することもできる。抽出溶媒が無毒のもの、例えば水である場合は、抽出溶媒を含んだまま調剤に使用することもできるが、抽出溶媒を分離した抽出物を調剤に用いることもできる。抽出溶媒分離後の抽出物を適当な 50

溶剤、例えば水に再溶解させて、調剤に使用することもできる。また、このようにして得た抽出物を精製手段、例えば分別抽出、二溶媒間の分配、適当な吸着剤による分別吸着 / 溶離ないしクロマトグラフィー等によって、精製ないし力価の向上を行うこともできる。

#### 【0021】

上記のように得られたネムノキ抽出物は、そのまま抗酸化剤として利用することもできるが、外用剤に配合して利用することが好ましい。外用剤への配合量は、吸収程度、作用程度、製品形態、使用頻度等によって決められ、特に限定されるものではないが、乾燥重量で0.00001~5.0重量%の濃度範囲とすることが望ましく、好ましくは0.00005~3.0重量%の範囲であり、特に0.0001~1.0重量%の範囲が好ましい。ネムノキ抽出物の含有量が0.00001重量%未満であると十分な効果が発揮されず、5.0重量%以上加えても効果はほぼ定常である。

10

#### 【0022】

本発明の抗酸化剤は、ネムノキ抽出物を有効成分とする。本発明における抗酸化作用とは、生体における細胞や組織に作用されることによって、ネムノキ抽出物に含まれる抗酸化物質によるスカベンジャー作用に加え、生体内における抗酸化関連酵素および / またはレドックス関連因子の発現亢進作用、特に抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子の遺伝子発現亢進作用をも含む。また、これらの作用により、細胞内の活性酸素量を低減する作用を発揮する。

#### 【0023】

本発明において、抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子の遺伝子発現亢進作用は、培養細胞に本発明の抗酸化剤を添加し、細胞内の遺伝子発現量をリアルタイムPCRを用いて定量することで評価することができる。また本発明において、細胞内の活性酸素量は、活性酸素に反応する蛍光物質を培養細胞に取り込ませ、本発明の抗酸化剤を添加し、細胞内から発せられる蛍光強度を定量することで評価することができる。

20

#### 【0024】

抗酸化関連酵素および / またはレドックス関連因子としては、例えば活性酸素種を消去するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、ペルオキシレドキシシン(PRX); グルタチオン(GSH)やチオレドキシシン(TXN)の酸化・還元状態を制御するグルタチオンレダクターゼ(GRD)、チオレドキシシンレダクターゼ(TRD)、グルタレドキシシン(GXN); ラジカルを還元、消去する酵素; 脂質酸化で生じるヒドロペルオキシドを還元するグルタチオンペルオキシダーゼ、カルボニル基をもつ中間体(4-ヒドロキシノネナール等)を還元する、-ヒドロゲナーゼ等; フェントン反応が生じないように遷移金属イオンを貯蔵、輸送するタンパク質(フェリチン, トランスフェリン等); 酸化損傷を受けた分子を分解するプロテアーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、クロロフィル分解酵素、フェオホルピドaオキシゲナーゼ等; 活性酸素種によって酸化された分子を修復するメチオニンスルフォキシドレダクターゼ, DNA修復酵素等が挙げられる。

30

#### 【0025】

本発明においてネムノキ抽出物は、特にSOD、PRX、TXN、TRD、GRDおよびGXNの遺伝子発現量を亢進することにより、生体内の抗酸化関連酵素および / またはレドックス関連因子量を増大させ、生体内で発生する活性酸素を低減し、抗酸化能を発揮するものと推察される。

40

#### 【0026】

本発明の抗酸化剤は、ネムノキ抽出物以外に、本発明の効果を損なわない範囲で、その他の原料を含むことができる。そのような原料の例としては水、賦形剤、抗酸化剤、防腐剤、湿潤剤、粘稠剤、緩衝剤、吸着剤、溶剤、乳化剤、安定化剤、界面活性剤、滑沢剤、水溶性高分子、甘味料、矯味剤、酸味料、アルコール類等が挙げられる。また、本発明の抗酸化剤は、本発明の効果を損なわない範囲で、その他の有効成分を含むことができる。有効成分の具体例として、例えば、抗酸化成分、老化防止成分、抗炎症成分、美白成分、細胞賦活化成分、ビタミン類、血行促進成分、保湿成分、DNAの損傷の予防及び / 又は

50

修復作用を有する成分、抗糖化成分、ペプチド又はその誘導体、アミノ酸又はその誘導体、ヒドロキノン配糖体及びそのエステル類等が挙げられる。

【0027】

本発明の抗酸化剤は、ネムノキ抽出物の必須成分に加えて、必要に応じて本発明の効果を損なわない範囲内で、化粧品類、医薬部外品類、飲食品類、医薬品類等に使用される成分や添加剤を併用して配合することができる。

【0028】

例えば、油脂類としては、アボガド油、アルモンド油、ウイキョウ油、エゴマ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラファ油、ゴマ油、カカオ脂、カミツレ油、カロット油、キューカンバー油、牛脂、牛脂脂肪酸、クイナツ油、サフラワー油、大豆油、ツバキ油、トウモロコシ油、ナタネ油、パーシク油、ヒマシ油、綿実油、落花生油、タートル油、ミンク油、卵黄油、カカオ脂、パーム油、パーム核油、モクロウ、ヤシ油、牛脂、豚脂、硬化油、硬化ヒマシ油等が挙げられる。

10

【0029】

ロウ類としては、ミツロウ、カルナバロウ、鯨ロウ、ラノリン、液状ラノリン、還元ラノリン、硬質ラノリン、カンデリラロウ、モンタンロウ、セラックロウ等が挙げられる。

【0030】

鉱物油としては、流動パラフィン、ワセリン、パラフィン、オゾケライド、セレシン、マイクロクリスタンワックス、ポリエチレン末、スクワレン、スクワラン、プリスタン等が挙げられる。

20

【0031】

脂肪酸類としては、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、オレイン酸、12-ヒドロキシステアリン酸、ウンデシレン酸、トール油、ラノリン脂肪酸等の天然脂肪酸、イソノナン酸、カブロン酸、2-エチルブタン酸、イソペンタン酸、2-メチルペンタン酸、2-エチルヘキサン酸、イソペンタン酸等の合成脂肪酸が挙げられる。

【0032】

アルコール類としては、エタノール、イソプロパノール、ラウリルアルコール、セタノール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ラノリンアルコール、コレステロール、フィトステロール等の天然アルコール、2-ヘキシルデカノール、イソステアリルアルコール、2-オクチルドデカノール等の合成アルコール、酸化エチレン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ポリエチレングリコール、酸化プロピレン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、グリセリン、パチルアルコール、ペンタエリトリール、ソルビトール、マンニトール、ブドウ糖、ショ糖等の多価アルコール類等が挙げられる。

30

【0033】

エステル類としては、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、ラウリン酸ヘキシル、ミリスチン酸ミリスチル、オレイン酸オレイル、オレイン酸デシル、ミリスチン酸オクチルドデシル、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシル、乳酸セチル、乳酸ミリスチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、酢酸ラノリン、モノステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸プロピレングリコール、ジオレイン酸プロピレングリコール等が挙げられる。

40

【0034】

金属セッケンとしては、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸カルシウム、パルミチン酸亜鉛、ミリスチン酸マグネシウム、ラウリン酸亜鉛、ウンデシレン酸亜鉛等が挙げられる。

【0035】

ガム質及び水溶性高分子化合物としては、アラビアゴム、ベンゾインゴム、ダンマルゴ

50

ム、グアヤク脂、アイルランド苔、カラヤゴム、トラガントゴム、キャロブゴム、クインシード、寒天、カゼイン、デキストリン、ゼラチン、ペクチン、デンプン、カラギーナン、カルボキシアルキルキチン、キトサン、ヒドロキシアルキルキチン、低分子キトサン、キトサン塩、硫酸化キチン、リン酸化キチン、アルギン酸及びその塩、ヒアルロン酸及びその塩、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、エチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ニトロセルロース、結晶セルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメタアクリレート、ポリアクリル酸塩、ポリエチレンオキサイドやポリプロピレンオキサイド等のポリアルキレンオキサイド又はその架橋重合体、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレンイミン等が挙げられる。

10

## 【0036】

界面活性剤としては、アニオン界面活性剤（カルボン酸塩，スルホン酸塩，硫酸エステル塩，リン酸エステル塩）、カチオン界面活性剤（アミン塩，四級アンモニウム塩）、両性界面活性剤（カルボン酸型両性界面活性剤，硫酸エステル型両性界面活性剤，スルホン酸型両性界面活性剤，リン酸エステル型両性界面活性剤）、非イオン界面活性剤（エーテル型非イオン界面活性剤，エーテルエステル型非イオン界面活性剤，エステル型非イオン界面活性剤，ブロックポリマー型非イオン界面活性剤，含窒素型非イオン界面活性剤）、その他の界面活性剤（天然界面活性剤，タンパク質加水分解物の誘導体，高分子界面活性剤，チタン・ケイ素を含む界面活性剤，フッ化炭素系界面活性剤）等が挙げられる。

20

## 【0037】

ビタミン類としては、ビタミンA群ではレチノール、レチナール（ビタミンA1）、デヒドロレチナール（ビタミンA2）、カロチン、リコピン（プロビタミンA）、ビタミンB群では、チアミン塩酸塩、チアミン硫酸塩（ビタミンB1）、リボフラビン（ビタミンB2）、ピリドキシン（ビタミンB6）、シアノコバラミン（ビタミンB12）、葉酸類、ニコチン酸類、パントテン酸類、ピオチン類、コリン、イノシトール類、ビタミンC群では、アスコルビン酸及びその誘導体、ビタミンD群では、エルゴカルシフェロール（ビタミンD2）、コレカルシフェロール（ビタミンD3）、ジヒドロタキステロール、ビタミンE群では、トコフェロール及びその誘導体、ユビキノール類、ビタミンK群では、フィトナジオン（ビタミンK1）、メナキノール（ビタミンK2）、メナジオン（ビタミンK3）、メナジオール（ビタミンK4）等が挙げられる。

30

## 【0038】

アミノ酸としては、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、システイン、シスチン、チロシン、プロリン、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒドロキシリジン、アルギニン、オルニチン、ヒスチジン等や、それらの硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、クエン酸塩、あるいはピロリドンカルボン酸の如きアミノ酸誘導体等が挙げられる。

## 【0039】

美白剤としては、アスコルビン酸又はその誘導体、イオウ、胎盤加水分解物、エラグ酸又はその誘導体、コウジ酸又はその誘導体、グルコサミン又はその誘導体、アルブチン又はその誘導体、ヒドロキシケイヒ酸又はその誘導体、グルタチオン、アルニカエキス、オウゴンエキス、ソウハクヒエキス、サイコエキス、ポウフウエキス、マンネンタケ菌糸体培養物又はその抽出物、シナノキエキス、モモ葉エキス、エイジツエキス、クジンエキス、ジユエキス、トウキエキス、ヨクイニンエキス、カキ葉エキス、ダイオウエキス、ボタンピエキス、ハマメリスエキス、マロニエエキス、オトギリソウエキス、油溶性カンゾウエキス等が挙げられる。

40

## 【0040】

保湿剤としては、ヒアルロン酸、ポリグルタミン酸、セリン、グリシン、スレオニン、アラニン、コラーゲン、加水分解コラーゲン、ヒドロネクチン、フィブロネクチン、ケラ

50



チン、エラスチン、ローヤルゼリー、コンドロイチン硫酸ヘパリン、グリセロリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴリン脂質、スフィンゴ糖脂質、リノール酸又はそのエステル類、エイコサペンタエン酸又はそのエステル類、ペクチン、ピフィズス菌発酵物、乳酸発酵物、酵母抽出物、レイシ菌系体培養物又はその抽出物、小麦胚芽油、アボガド油、米胚芽油、ホホバ油、ダイズリン脂質、 $\gamma$ -オリザノール、ピロウドアオイエキス、ヨクイニンエキス、ジオウエキス、タイソウエキス、カイソウエキス、キダチアロエエキス、ゴボウエキス、マンネンロウエキス、アルニカエキス、小麦フスマ等が挙げられる。

【0041】

育毛剤としては、ペンタデカン酸グリセリド、コレウスエキス、ゲンチアナエキス、マツカサエキス、ローヤルゼリーエキス、クマザサエキス、 $t$ -フラバノン、6-ベンジルアミノプリン、センブリエキス、塩化カルプロニウム、ミノキシジル、フィナスチド、アデノシン、ニコチン酸アミド、桑の根エキス、ジオウエキス、5-アミノレブリン酸等が挙げられる。

10

【0042】

動物或いは植物、生薬の抽出物やエキスとしては、アセンヤク（阿仙薬）、アシタバ、アセロラ、アルテア、アルニカ、アボカド、アマチャ（甘茶）、アロエ、アロエベラ、イラクサ、イチヨウ（銀杏葉、銀杏）、ウイキョウ（茴香）、ウコン（鬱金）、ウスバサイシン（細辛）、ウメ（烏梅）、ウラジロガシ、ウワウルシ、ノイバラ（営実）、ヒキオコシ（延命草）、オウギ（黄耆）、コガネバナ（オウゴン）、ヤマザクラ（桜皮）、キハダ（黄柏）、オウレン（黄連）、オタネニンジン（人参）、オトギリソウ（弟切草）、オドリコソウ、オランダガラシ、オレンジ、イトヒメハギ（遠志）、ウツボグサ（夏枯草）、ツルドクダミ（何首烏）、エンジュ（槐花）、ヨモギ（ガイ葉）、ガジュツ（莪朮）、クズ（葛根）、カノコソウ（吉草根）、カミツレ、キカラスウリ（瓜呂根）、カワラヨモギ（茵陈蒿）、カンゾウ（甘草）、フキタンポポ（款冬花、款冬葉）、キイチゴ、キウイ果実、キキョウ（桔梗）、キク（菊花）、キササゲ（梓実）、ミカン属植物果実（枳実）、タチバナ（橘皮）、キュウリ、ウドまたはシシウド（羌活、独活）、アンズ（杏仁）、クコ（地骨皮、枸杞子、枸杞葉）、クララ（苦参）、クスノキ、クマザサ、グレープフルーツ果実、ニッケイ（桂皮）、ケイガイ（ケイガイ）、エビスグサ（決明子）、マルバアサガオ又はアサガオ（ケン牛子）、ベニバナ（紅花）、ゴバイシ（五倍子）、コンフリー、コバイバ、クチナシ（山梔子）、ゲンチアナ、ホオノキ（厚朴）、ヒナタイノコズチ（牛膝）、ゴシュユ（呉茱萸）、ゴボウ、チョウセンゴミシ（五味子）、米、米ぬか、コムギ、ミシマサイコ（柴胡）、サフラン、サボンソウ、サンザシ（山ザ子）、サンショウ（山椒）、サルビア、サンシチニンジン（三七人参）、シイタケ（椎茸）、ジオウ（地黄）、シクンシ（使君子）、ムラサキ（紫根）、シソ（紫蘇葉、紫蘇子）、カキ（柿蒂）、シャクヤク（芍薬）、オオバコ（車前子、車前草）、ショウガ（生姜）、ショウブ（菖蒲）、トウネズミモチ（女貞子）、シモツケソウ、シラカバ、スイカズラ（金銀花、忍冬）、セイヨウキツタ、セイヨウノコギリソウ、セイヨウニワトコ、アズキ（赤小豆）、ニワトコ（接骨木）、ゼニアオイ、センキュウ（川キュウ）、センブリ（当薬）、クワ（桑白皮、桑葉）、ナツメ（大棗）、ダイズ、タラノキ、チクセツニンジン（竹節人参）、ハナスゲ（知母）、ワレモコウ（地榆）、ドクダミ（十薬）、フコムシナツクサタケ（冬虫夏草）、トウガラシ、ホオズキ（登呂根）、タチジャコウソウ、リョクチャ（緑茶）、コウチャ（紅茶）、チョウジ（丁子）、ウンシュウミカン（陳皮）、ツバキ、ツボクサ、トウガラシ（番椒）、トウキ（当归）、トウキンセンカ、ダイダイ（橙皮）、ワレモコウ（地榆）、トウモロコシ（南蛮毛）、トチュウ（杜仲、杜仲葉）、トマト、ナンテン（南天実）、ニンニク（大サン）、オオムギ（麦芽）、ハクセン（白蘚皮）、ジャノヒゲ（麦門冬）、パセリ、バタタ、ハッカ（薄荷）、ハマメリス、バラ、ビワ葉（枇杷葉）、マツホド（茯リョウ）、ブドウまたはその葉、ヘチマ、ボダイジュ、ボタン（牡丹皮）、ホップ、マイカイ（マイ玫瑰花）、松葉、マロニエ、マンネンロウ、ムクロジ、メリッサ、メリロート、ボケ（木瓜）、モヤシ、モモ（桃仁、桃葉）、ヒオウギ（射干）、ピンロウジュ（檳ロウ子）、メハジキ（益母草）、ヤグルマギク、ユキノシタ（虎耳草）、ヤマモモ（楊梅皮）、

20

30

40

50

ヤシャブシ（矢車）、ハトムギ（ヨクイニン）、モウコヨモギ、ヤマヨモギ、ラベンダー、リンゴ果実、マンネンタケ（靈芝）、レモン果実、レンギョウ（連翹）、レンゲソウ、ゲンノショウコ（老鶴草）、ハシリドコロ（ロート根）、鶏トサカ、牛・人の胎盤抽出物、豚・牛の胃、十二指腸、或いは腸の抽出物若しくはその分解物、水溶性コラーゲン、水溶性コラーゲン誘導体、コラーゲン加水分解物、エラスチン、エラスチン加水分解物、水溶性エラスチン誘導体、シルク蛋白、シルク蛋白分解物、牛血球蛋白分解物等が挙げられる。

【0043】

微生物培養代謝物としては、酵母エキス、亜鉛含有酵母エキス、ゲルマニウム含有酵母エキス、セレン含有酵母エキス、マグネシウム含有酵母エキス、米醗酵エキス、ユーグレナ抽出物、脱脂粉乳の乳酸発酵物等が挙げられる。

10

【0044】

- ヒドロキシ酸としては、グリコール酸、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸等が挙げられる。

【0045】

無機顔料としては、無水ケイ酸、ケイ酸マグネシウム、タルク、カオリン、ベントナイト、マイカ、雲母チタン、オキシ塩化ビスマス、酸化ジルコニウム、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、酸化チタン、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、黄酸化鉄、ベンガラ、黒酸化鉄、ゲンジョウ、酸化クロム、水酸化クロム、カーボンブラック、カラミン等が挙げられる。

20

【0046】

紫外線吸収剤としては、p - アミノ安息香酸誘導体、サルチル酸誘導体、アントラニル酸誘導体、クマリン誘導体、アミノ酸系化合物、ベンゾトリアゾール誘導体、テトラゾール誘導体、イミダゾリン誘導体、ピリミジン誘導体、ジオキササン誘導体、カンファー誘導体、フラン誘導体、ピロン誘導体、核酸誘導体、アラントイン誘導体、ニコチン酸誘導体、ビタミンB6誘導体、オキシベンゾン、ベンゾフェノン、グアイアズレン、シコニン、バイカリン、バイカレイン、ベルベリン等が挙げられる。

【0047】

収斂剤としては、乳酸、酒石酸、コハク酸、クエン酸、アラントイン、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、酸化亜鉛、カラミン、p - フェノールスルホン酸亜鉛、硫酸アルミニウムカリウム、レソルシン、塩化第二鉄、タンニン酸等が挙げられる。

30

【0048】

抗酸化剤としては、アスコルビン酸及びその塩、ステアリン酸エステル、トコフェロール及びそのエステル誘導体、ノルジヒドログアセレン酸、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、パラヒドロキシアニソール、没食子酸プロピル、セサモール、セサモリン、ゴシポール等が挙げられる。

【0049】

抗炎症剤としては、イクタモール、インドメタシン、カオリン、サリチル酸、サリチル酸ナトリウム、サリチル酸メチル、アセチルサリチル酸、塩酸ジフェンヒドラミン、d - 又はd l - カンフル、ヒドロコルチゾン、グアイアズレン、カマズレン、マレイン酸クロルフェニラミン、グリチルリチン酸及びその塩、グリチルレチン酸及びその塩等が挙げられる。

40

【0050】

殺菌・消毒薬としては、アクリノール、イオウ、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化メチルロザニリン、クレゾール、グルコン酸カルシウム、グルコン酸クロルヘキシジン、スルファミン、マーキュロクロム、ラクトフェリン又はその加水分解物等が挙げられる。

【0051】

頭髪用剤としては、二硫化セレン、臭化アルキルイソキノリニウム液、ジンクピリチオン、ピフェナミン、チアントール、カスターチンキ、ショウキョウチンキ、トウガラシチ

50

ンキ、塩酸キニーネ、強アンモニア水、臭素酸カリウム、臭素酸ナトリウム、チオグリコール酸等が挙げられる。

【0052】

香料としては、ジャコウ、シベット、カストリウム、アンバーgris等の天然動物性香料、アニス精油、アンゲリカ精油、イラン精油、イリス精油、ウイキョウ精油、オレンジ精油、カナンガ精油、カラウェー精油、カルダモン精油、グアヤクウッド精油、クミン精油、黒文字精油、ケイ皮精油、シンナモン精油、ゲラニウム精油、コパイババルサム精油、コリアンデル精油、シソ精油、シダーウッド精油、シトロネラ精油、ジャスミン精油、ジンジャーグラス精油、杉精油、スペアミント精油、西洋ハッカ精油、大茴香精油、チュペローズ精油、丁字精油、橙花精油、冬緑精油、トルーバルサム精油、パチュリー精油、バラ精油、パルマローザ精油、檜精油、ヒバ精油、白檀精油、プチグレン精油、ベイ精油、ベチバ精油、ベルガモット精油、ペルーバルサム精油、ポアドローズ精油、芳樟精油、マンダリン精油、ユーカリ精油、ライム精油、ラベンダー精油、リナロエ精油、レモングラス精油、レモン精油、ローズマリー精油、和種ハッカ精油等の植物性香料、その他合成香料等が挙げられる。

10

【0053】

色素・着色剤としては、赤キャベツ色素、赤米色素、アカネ色素、アナトー色素、イカスミ色素、ウコン色素、エンジュ色素、オキアミ色素、柿色素、カラメル、金、銀、クチナシ色素、コーン色素、タマネギ色素、タマリンド色素、スピルリナ色素、ソバ全草色素、チェリー色素、海苔色素、ハイビスカス色素、ブドウ果汁色素、マリーゴールド色素、紫イモ色素、紫ヤマイモ色素、ラック色素、ルチン等が挙げられる。

20

【0054】

甘味料としては、砂糖、甘茶、果糖、アラビノース、ガラクトース、キシロース、マンノース、麦芽糖、蜂蜜、ブドウ糖、ミラクリン、モネリン等が挙げられる。

【0055】

栄養強化剤としては、貝殻焼成カルシウム、シアノコラバミン、酵母、小麦胚芽、大豆胚芽、卵黄粉末、ヘミセルロース、ヘム鉄等が挙げられる。

【0056】

その他、ホルモン類、金属イオン封鎖剤、pH調整剤、キレート剤、防腐・防バイ剤、清涼剤、安定化剤、乳化剤、動・植物性蛋白質及びその分解物、動・植物性多糖類及びその分解物、動・植物性糖蛋白質及びその分解物、血流促進剤、消炎剤・抗アレルギー剤、細胞賦活剤、角質溶解剤、創傷治療剤、増泡剤、増粘剤、口腔用剤、消臭・脱臭剤、苦味料、調味料、酵素等が挙げられる。

30

【0057】

本発明の剤型は任意であり、アンプル状、カプセル状、粉末状、顆粒状、丸剤、錠剤状、固形状、液状、ゲル状、気泡状、乳液状、クリーム状、軟膏状、シート状、ムース状等の医薬部外品類、皮膚・頭髪用化粧品類及び浴用剤化、飲食品類、医薬品類に配合して用いることができる。

【0058】

具体的には、化粧品類、医薬部外品類としては、例えば内用・外用薬用製剤、化粧水、乳液、クリーム、軟膏、ローション、オイル、パック等の基礎化粧品、洗顔料や皮膚洗浄料、シャンプー、リンス、ヘアトリートメント、ヘアクリーム、ポマード、ヘアスプレー、整髪料、パーマ剤、ヘアトリック、染毛料、育毛・養毛料等の頭髪化粧品、ファンデーション、白粉、おしろい、口紅、頬紅、アイシャドウ、アイライナー、マスカラ、眉墨、まつ毛等のメイクアップ化粧品、美爪料等の仕上げ用化粧品、香水類、浴用剤、その他、歯磨き類、口中清涼剤・含嗽剤、液臭・防臭防止剤、衛生用品、衛生綿類、ウエットティッシュ等が挙げられる。

40

【0059】

飲食品類としては、例えば清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料等の飲料、アイスクリーム、アイスシャーベット、かき氷等の冷菓、そば、うどん、はるさめ、

50

ぎょうざの皮、しゅうまいの皮、中華麺、即席麺等の麺類、飴、キャンディー、ガム、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子、パン等の菓子類、カニ、サケ、アサリ、マグロ、イワシ、エビ、カツオ、サバ、クジラ、カキ、サンマ、イカ、アカガイ、ホタテ、アワビ、ウニ、イクラ、トコブシ等の水産物、かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品、粉乳、加工乳、発酵乳等の乳製品、サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂及び油脂加工食品、ソース、たれ等の調味料、カレー、シチュー、親子丼、お粥、雑炊、中華丼、かつ丼、天丼、うな丼、ハヤシライス、おでん、マーボドーフ、牛丼、ミートソース、玉子スープ、オムライス、餃子、シューマイ、ハンバーグ、ミートボール等のレトルトパウチ食品、種々の形態の健康・栄養補助食品、保健機能食品、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤、トローチ等が挙げられる。

10

【0060】

本発明の抗酸化剤は、ヒトに対して好適に適用されるものであるが、それぞれの作用効果が期待できる限り、ヒト以外の動物に対して適用することもできる。

【0061】

本発明の抗酸化剤の態様は、特に限定されないが、例えば、洗顔料、洗浄料、化粧水（例えば、美白化粧水）、クリーム（例えば、パニングクリーム、コールドクリーム）、乳液、ゲル、美容液、パック（例えば、ゼリー状ピールオフタイプ、ペースト状拭き取りタイプ、粉末状洗い流しタイプ）、フェイスマスク、クレンジング、ファンデーション、口紅、リップクリーム、リップグロス、リップライナー、頬紅、化粧下地、シェービングローション、サンスクリーン、アフターサンローション、デオドラントローション、ボディローション（ハンドケアローション、フットケアローションを含む）、ボディオイル等が挙げられる。

20

【0062】

以下、本発明を実施例に基づき、より詳細に説明する。なお、本発明は、実施例に特に限定されるものではない。

【実施例】

【0063】

以下の実施例において用いたネムノキ樹皮の水抽出物は、特開2018-58783号に開示される方法により調製されたものを用いた。

30

【0064】

実施例1：ヒト正常新生児表皮角化細胞における標的遺伝子に対する発現亢進作用の評価  
前記ネムノキ抽出物を被験試料として用い、下記試験方法により標的遺伝子に対する発現亢進作用を評価した。本実施例における標的遺伝子とは、SOD、PRX、TXN、TRD、GRDおよびGXNを意味する。

【0065】

Collagen Coating Solution（東洋紡株式会社製）でコラーゲンコートしたT75フラスコに対して、ヒト正常新生児表皮角化細胞（NHEK）を播種し、正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地（HuMedia-KG2）を添加して、37℃、10%CO<sub>2</sub>にて培養した。適宜培地交換をおこない、80%以上コンフルエントになるまで培養を継続した。培地を除去してPBSでリンスした後、トリプシン処理を行って細胞を回収した。96ウェルプレートに1×10<sup>4</sup> cells/wellとなるように細胞を播種し、37℃、10%CO<sub>2</sub>にて1日培養した。

40

培地を除去し、被験試料を所定濃度含有した培地に交換し、37℃、10%CO<sub>2</sub>にて72時間インキュベートした。培養後は細胞を回収し、SuperPrep（登録商標）Cell Lysis & RT Kit for qPCR（東洋紡株式会社製）を用いて、細胞からcDNA調製を行った。

【0066】

得られたcDNAをもとに、THUNDERBIRD SYBR（登録商標）qPCR Mix（東洋紡株式会社製）を用いて、リアルタイムPCR解析を行った。反応液組成は

50

添付文書に従った。ただし、反応液量は  $20 \mu\text{l} / \text{well}$  とし、cDNA量は  $3 \mu\text{l}$  とした。反応サイクル条件は  $95^\circ\text{C}$ 、1分 ( $95^\circ\text{C}$ 、15秒  $60^\circ\text{C}$ 、45秒)  $\times 40$   $95^\circ\text{C}$ 、15秒  $60^\circ\text{C}$ 、1分  $95^\circ\text{C}$ 、15秒で実施した。プライマーは配列番号1~6に示される塩基配列を使用した。機器は7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を内部標準として使用し、標的遺伝子の発現量を標準化した (配列番号13~14)。標準化したそれぞれの標的遺伝子の発現量を、被験試料を含まない陰性対照の遺伝子の発現量で除算し、相対値を算出した。

**【0067】**

10

得られた結果を図1~3に示す。図1~3から分かるように、NHEKにおいて、ネムノキ抽出物を添加していない陰性対照と比較して、抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現量が向上していることが確認された。本結果から、ネムノキ抽出物は、表皮細胞において抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現を亢進し、生体内の抗酸化能を向上させる作用を有することが明らかとなった。

**【0068】**

実施例2：ヒト正常新生児線維芽細胞における標的遺伝子に対する発現亢進作用の評価

T75フラスコに対して、ヒト正常新生児線維芽細胞 (NHDF) を播種し、D-MEM (+10% FBS) を添加して、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて培養した。適宜培地交換を行い、80%以上コンフルエントになるまで培養を継続した。培地を除去してPBSでリンスした後、トリプシン処理を行って細胞を回収した。96ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells/well となるように細胞を播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて1日培養した。

20

培地を除去し、被験試料を所定濃度含有した培地に交換し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて72時間インキュベートした。培養後は細胞を回収し、Super Prep (登録商標) Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡株式会社製) を用いて、細胞からcDNA調製を行った。

**【0069】**

得られたcDNAをもとに、THUNDERBIRD SYBR (登録商標) qPCR Mix (東洋紡株式会社製) を用いて、リアルタイムPCR解析を行った。反応液組成は添付文書に従った。ただし、反応液量は  $20 \mu\text{l} / \text{well}$  とし、cDNA量は  $3 \mu\text{l}$  とした。反応サイクル条件は  $95^\circ\text{C}$ 、1分 ( $95^\circ\text{C}$ 、15秒  $60^\circ\text{C}$ 、45秒)  $\times 40$   $95^\circ\text{C}$ 、15秒  $60^\circ\text{C}$ 、1分  $95^\circ\text{C}$ 、15秒で実施した。プライマーは配列番号1~12に示される塩基配列を使用した。機器は7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を内部標準として使用し、標的遺伝子の発現量を標準化した (配列番号13~14)。標準化したそれぞれの標的遺伝子の発現量を、被験試料を含まない陰性対照の遺伝子の発現量で除算し、相対値を算出した。

30

**【0070】**

得られた結果を図4~9に示す。図4~9から分かるように、NHDFにおいて、ネムノキ抽出物を添加していない陰性対照と比較して、抗酸化関連酵素及びレドックス関連因子の遺伝子発現量が向上していることが確認された。本結果から、ネムノキ抽出物は、表皮細胞において抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現を亢進し、生体内の抗酸化能を向上させる作用を有することが明らかとなった。

40

**【0071】**

実施例3：ヒト正常新生児線維芽細胞における活性酸素低減作用の評価

T75フラスコに対して、ヒト正常新生児線維芽細胞 (NHDF) を播種し、D-MEM (+10% FBS) を添加して、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて培養した。適宜培地交換を行い、80%以上コンフルエントになるまで培養を継続した。培地を除去してPBSでリンスした後、トリプシン処理を行って細胞を回収した。96ウェルプレートに  $3 \times 10^4$  c

50

cells/wellとなるように細胞を播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて1日培養した。

培養を除去してHBSSで洗浄した後、20μM H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)に置換し、37℃、CO<sub>2</sub> 5% (暗所)で30分インキュベートした。H<sub>2</sub>DCFDAを除去してHBSSで洗浄し、被験試料及び過酸化水素を所定濃度含有したHBSSに置換し、さらに37℃、CO<sub>2</sub> 5% (暗所)でインキュベートし、5時間後に蛍光測定器 (ARVO MX)でEx/Em = 485nm/535nmで蛍光強度を測定した。

#### 【0072】

得られた結果を図10に示す。図10から分かるように、NHDFにおいて、過酸化水素による酸化ストレスによって誘導された細胞内の活性酸素が低減する効果を確認できた。これは、ネムノキ抽出物に含まれる抗酸化作用に加え、抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現が亢進されたことにより、生体自身の活性酸素消去能が向上し、生体内の活性酸素の低減につながったと考えられる。

#### 【0073】

実施例4：生体から採取した細胞における抗酸化関連遺伝子に対する発現亢進作用の評価  
前記ネムノキ抽出物を2.0重量%含む水溶液を被験試料として用い、下記試験方法により標的遺伝子に対する発現亢進作用を評価した。本実施例における標的遺伝子とは、PRXを意味する。

#### 【0074】

被験者の顔に対して被験試料を塗布し、塗布区の顎鬚から細胞を取得して評価をおこなった。具体的には、被験試料塗布前及び、塗布後3時間において、被験者から塗布区にある顎鬚を抜去し、毛包細胞を採取した。細胞の保存はRNAlater (Qiagen社製)に浸漬して、RNA抽出まで4℃にて保管した。毛包細胞の採取を終えた後、RNeasy plus micro kit (Qiagen社製)を使用し、添付のプロトコールに従って、毛包細胞からtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAについて、ReverTra Ace (登録商標) qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社製)を使用し、添付のプロトコールに従って、cDNAを調製した。得られたcDNAをもとに、THUNDERBIRD SYBR (登録商標) qPCR Mix (東洋紡株式会社製)を用いて、リアルタイムPCR解析を行った。反応液組成は添付文書に従った。ただし、反応液量は20μl/wellとし、cDNA量は2μlとした。反応サイクル条件は95℃、1分 (95℃、15秒) × 40 (95℃、15秒) × 60 (95℃、15秒) × 1分 (95℃、15秒)で実施した。プライマーは配列番号7~8に示される塩基配列を使用した。機器は7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を内部標準として使用し、標的遺伝子の発現量を標準化した (配列番号13~14)。標準化したそれぞれの標的遺伝子の発現量を、被験試料塗布前の陰性対照における遺伝子の発現量で除算し、相対値を算出した。

#### 【0075】

得られた結果を図11に示す。図11から分かるように、毛包細胞から取得したcDNAにおいて、ネムノキ抽出物を塗布する前の陰性対照と比較して、塗布後3時間でPRXの遺伝子発現量が向上していることが確認された。本結果から、ネムノキ抽出物は、生体から採取した細胞においても、抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の遺伝子発現を亢進し、生体内の抗酸化能を向上させる作用を有することが明らかとなった。

#### 【0076】

実施例5：皮膚外用剤の処方

以下に、本発明における皮膚外用剤としての処方例を示す。これらの製剤は、いずれもネムノキ抽出物に起因する抗酸化関連酵素遺伝子発現亢進効果が期待され、抗酸化剤として有効である。

#### 【0077】

## 化粧水

下記組成に従い、化粧水を常法により製造した。

- ・精製水・・・89.80 g
- ・グリセリン・・・3.00 g
- ・フェノキシエタノール・・・0.20 g
- ・ブチレングリコール・・・5.00 g
- ・ペンチレングリコール・・・1.00 g
- ・ネムノキ抽出物・・・1.00 g

【0078】

## ジェル

下記組成に従い、ジェルを常法により製造した。

- ・精製水・・・88.50 g
- ・カルボマー・・・0.30 g
- ・キサンタンガム・・・0.10 g
- ・アルギニン・・・0.40 g
- ・グリセリン・・・5.00 g
- ・フェノキシエタノール・・・0.20 g
- ・ブチレングリコール・・・5.00 g
- ・ネムノキ抽出物・・・0.50 g

【0079】

## クリーム

下記組成に従い、クリームを常法により製造した。

- ・精製水・・・58.50 g
- ・ブチレングリコール・・・10.00 g
- ・グリセリン・・・5.00 g
- ・フェノキシエタノール・・・0.20 g
- ・エチルヘキシルグリセリン・・・0.20 g
- ・スクワラン・・・10.00 g
- ・オリーブ油・・・10.00 g
- ・ベヘニルアルコール・・・2.50 g
- ・ペンタステアリン酸ポリグリセリル-10・・・1.90 g
- ・ステアロイル乳酸Na・・・0.60 g
- ・パルミチン酸セチル・・・1.00 g
- ・ネムノキ抽出物・・・0.10 g

【産業上の利用可能性】

【0080】

本発明によれば、生体内における抗酸化関連酵素および/またはレドックス関連因子の発現を有意に促進することにより、安全かつ効率的に生体の酸化ストレスを減少させ、健康を維持し、また酸化ストレスに起因する様々な疾患及び症状を防ぐことが可能となり、特に化粧品、医薬部外品として、皮膚外用剤への適用において有用である。

10

20

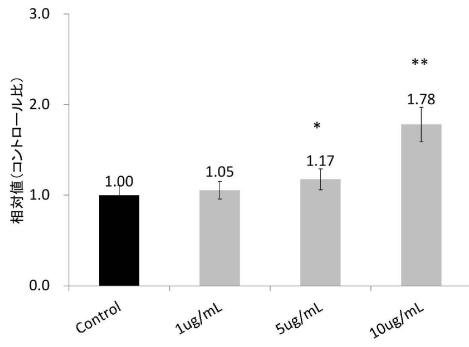
30

40

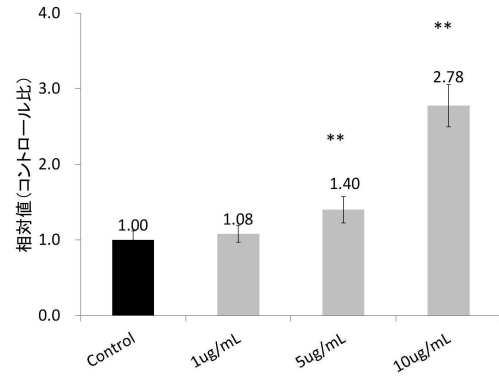
50

【 図面 】

【 図 1 】

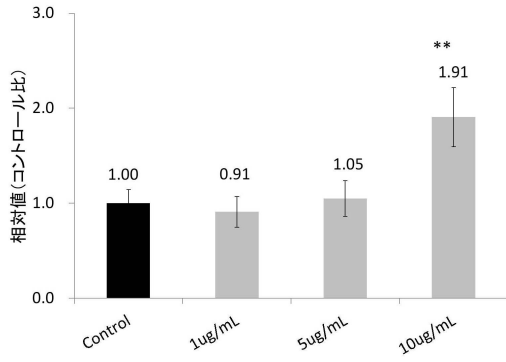


【 図 2 】

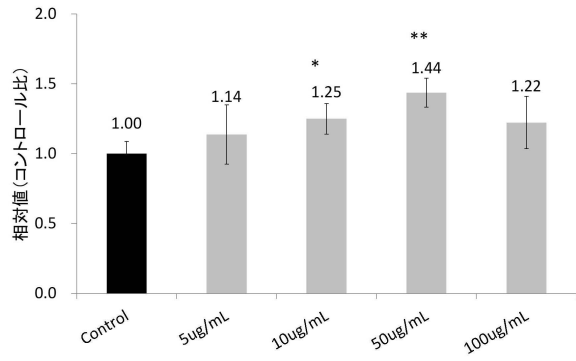


10

【 図 3 】



【 図 4 】



20

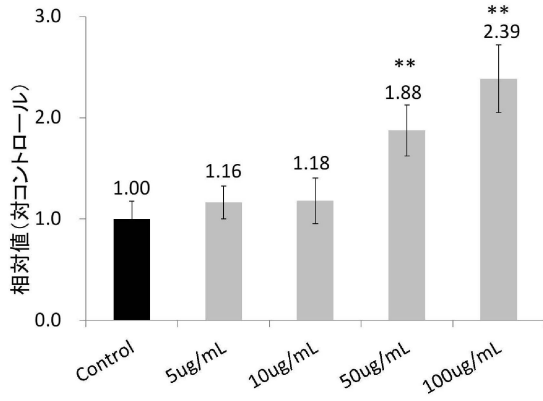
30

40

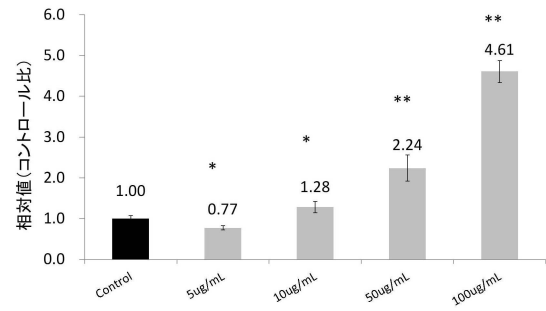
50



【 図 5 】

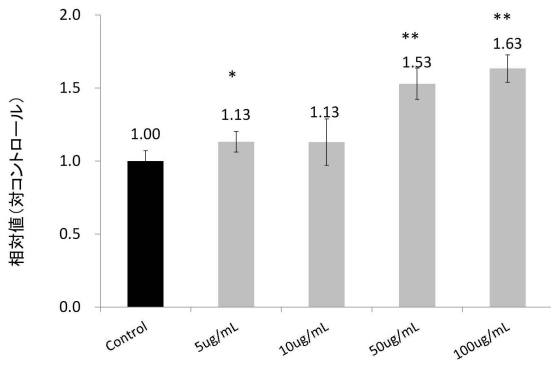


【 図 6 】

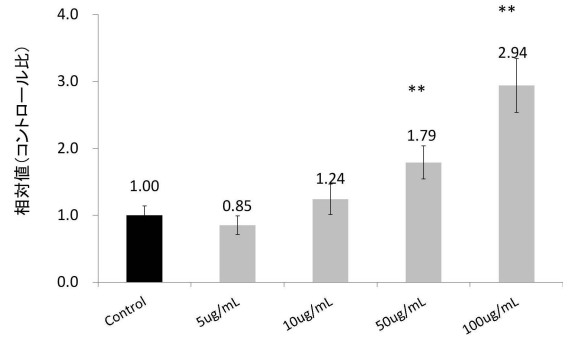


10

【 図 7 】

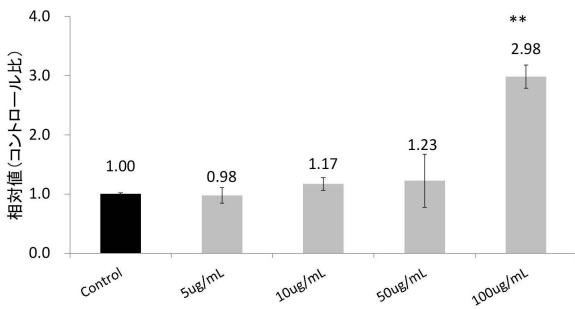


【 図 8 】

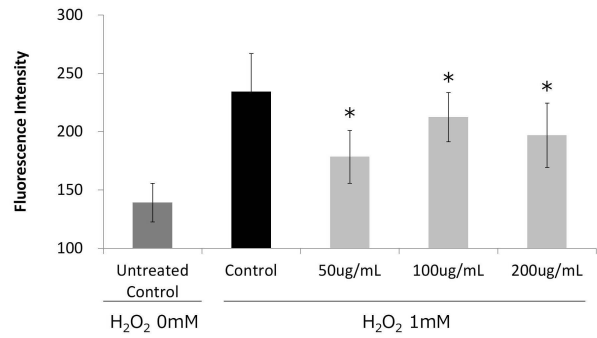


20

【 図 9 】



【 図 10 】

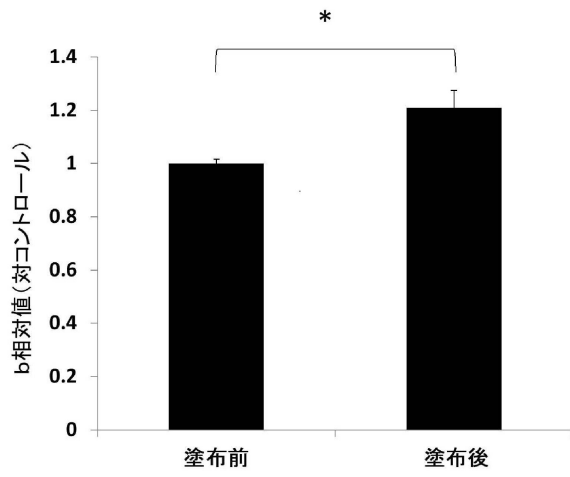


30

40

50

【 図 1 1 】



10

【 配列表 】

2023171681000001.xml

20

30

40

50